

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift

⑯ DE 43 20 023 A 1

⑯ Int. Cl. 5:

C 12 N 1/14

C 12 P 7/62

C 07 D 309/30

C 12 P 17/06

C 12 P 7/42

// (C12N 1/14, C12R

1:66) (C12P 7/62,

C12R 1:66) (C12P

17/06, C12R 1:66)

(C12P 7/42, C12R

1:66)

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

17.06.92 HU 9202020

⑯ Anmelder:

Biogal Gyógyszergyár, Debrecen, HU

⑯ Vertreter:

Beszédes, S., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
85221 Dachau

⑯ Erfinder:

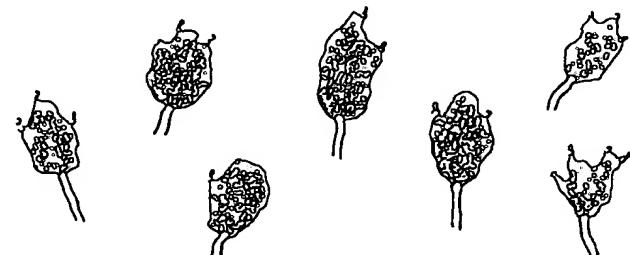
Jekkel, geb. Bokány, Antónia, Dr., Budapest, HU;
Ilköl, Eva, Dr., Budapest, HU; Szabó, István
Mihály, Dr., Budapest, HU; Ambrus, Gábor, Dr.,
Budapest, HU; Andor, Attila, Budapest, HU; Varga,
geb. Bösinger, Ilona, Budapest, HU; Moravcsik,
Imre, Budapest, HU; Szabo, István, Kecskemét, HU;
Erdei, János, Dr., Debrecen, HU; Pólya, Kálmán, Dr.,
Debrecen, HU; Kiss, András, Debrecen, HU; Cséke,
László, Debrecen, HU; Nagy, Károly, Debrecen, HU;
HU; Kaszás, Mihály, Debrecen, HU; Kiss, Lajos, Dr.,
Debrecen, HU; Magyi, István, Debrecen, HU;
Halász, Edit, Debrecen, HU; Sántha, György, Dr.,
Debrecen, HU

⑯ Holotyp-Stamm Aspergillus obscurus und Verfahren zur Herstellung von
 β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-(methyl)-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-
heptansäure- δ -lacton[Mevinolin] und/oder
 β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-(methyl)-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-
heptansäure

⑯ Gegenstand der Erfindung ist der Holotyp-Stamm Aspergillus obscurus n. sp. MV-1.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-(methyl)-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton und/oder von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-(methyl)-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure mittels

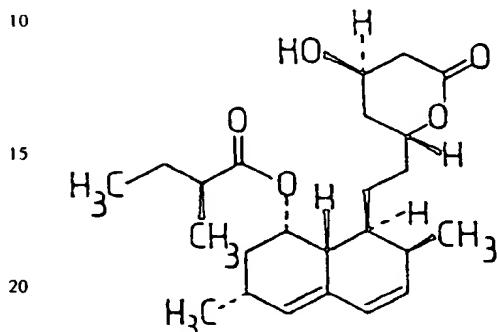
aerober Gärung der gesenkten Kultur eines die Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II biosynthetisierenden imperfekten Pilzstammes auf einem assimilierbaren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und gegebenenfalls Mineralsalze enthaltenden Nährboden und Isolierung der Verbindung der Formel I, bei welchem ein die obige(n) Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II produzierender Stamm der Pilzart Aspergillus obscurus bei 25 bis 30°C, gezüchtet wird sowie gegebenenfalls das (die) gebildete(n) Produkt(e) aus der Gärbrühe abgetrennt und dann in Form des Lactones der Formel I isoliert und gewünschtenfalls gereinigt wird/werden.



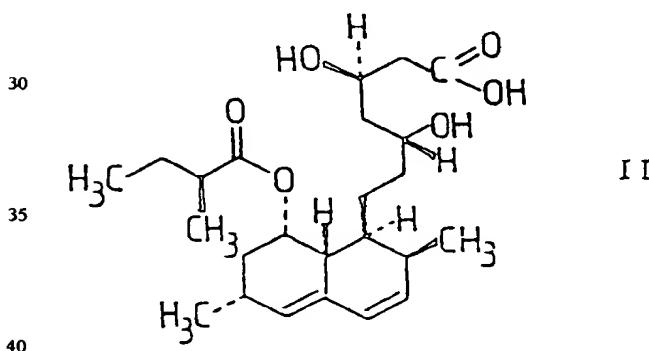
DE 43 20 023 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft den neuen Holotyp-Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 und ein Verfahren zur Herstellung von die im Organismus ablaufende Cholesterin-Biosynthese hemmendem β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure-8-lacton, auch (4R,6R)-6-[2-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-1,2,6,7,8,8a-Hexa-(hydro)-8-(hydroxy)-2,6-di-(methyl)-naphthalin-1-yl]-äthyl]-tetrahydro-4-(hydroxy)-2H-pyran-2-on-8-(S)-2-(methyl-butansäureester genannt, der Formel



25 und/oder β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure der Formel



insbesondere unter Verwendung des genannten Stammes. Für die erstgenannte Verbindung der Formel I ist die Kurzbezeichnung Mevinolin gebräuchlich. Im folgenden wird diese verwendet.

In Fadenpilzen synthetisiert sich das Mevinolin aus Acetateinheiten durch Polyketid-Stoffwechsel. Das Gerüst des Mevinolinmoleküls entsteht aus 9 Acetateinheiten, die Buttersäure-Seitenkette aus 2 Acetateinheiten. Das Mevinolin enthält auch 2 aus Methionin stammende Methylgruppen (R. N. Moore und Mitarbeiter: J. Am. Chem. Soc. 107 [1985], 3694 bis 3701). Das Mevinolin wurde erstmals 1979 von A. Endo aus der Pilzkultur *Monascus ruber* isoliert (J. Antibiot. 32 [1979], 852 bis 854), danach wurde es von A. W. Alberts und Mitarbeitern durch eine mit *Aspergillus terreus* vorgenommene Gärung hergestellt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, [1980], 3957 bis 3961).

Gegenwärtig ist das Mevinolin das in der Therapie am häufigsten verwendete, den Cholesterinspiegel über einen sehr günstigen Wirkungsmechanismus senkende Mittel. Die sich im Organismus bildende Form der offenen Hydroxsäure der Formel II ist nämlich ein wirksamer Hemmer des Reduktaseenzymes 3-(Hydroxy)-3-(methyl)-glutaryl-Coenzym A, welches die Bildung eines frühen Zwischenproduktes der Cholesterin-Biosynthese, der Mevalonsäure, katalysiert. Der Vorteil des Mevinolines besteht darin, daß sich bei seiner Anwendung die in späteren Phasen der Biosynthese entstehenden, toxischen Biosynthese-Zwischenprodukte mit Sterangerüst im Organismus nicht anhäufen.

Das Mevinolin verursacht mit seiner intrazellulären enzymhemmenden Wirkung eine Senkung der Cholesterin-Konzentration innerhalb der Zelle, und gleichzeitig erhöht es die Anzahl der sich in der Membran der Zelloberfläche befindenden LDL-Rezeptoren, welche das im Blut zirkulierende LDL-Cholesterin entfernen und damit eine Senkung des Cholesterinspiegels im Blutplasma bewirken.

Dem Patentschrifttum zufolge wurden zur Herstellung von Mevinolin enthaltenden Gärbrühen bisher die Kulturen folgender Mikroorganismen-Stämme verwendet: *Monascus anka*, *Monascus purpurous*, *Monascus ruber*, *Monascus vitreus*, *Monascus paxii* (GB-PS 2 046 737 und 2 049 664), *Aspergillus terreus* (US-PS 4 319 039 und 4 231 938).

Die Bildung von Mevinolin in kleinen Mengen wurde auch in den Pilzkulturen *Phoma* sp. M 4452, *Doratomyces nanus* IFO 9551 und *Gymnoascus umbrinus* IFO 8450 beobachtet (A. Endo und Mitarbeiter: J. Antibiot. 39 [1986], 1609 bis 1610).

Von R. L. Monaghan und Mitarbeitern wurden sogar mehrere Verfahren zur Gewinnung von Mevinolin aus

Gärbrühen beschrieben (US-PS 4 319 039). Gemäß eines ihrer Verfahren werden die Pilzzellen aus der Gärbrühe abfiltriert, dann wird das Mevinolin aus dem Filtrat mit Ethylacetat, von den Zellen hingegen mit 80%-igem wäßrigem Methanol extrahiert. Der durch Eindampfen der vereinigten Extrakte gewonnene Rückstand wird durch Chromatographieren zuerst an einer Silicagel-Säule mit Ethylacetat-Dichlormethan als Eluiermittel und dann an einer Sephadex LH-20-Säule mit Ethanol gereinigt. Danach wird durch Verwendung von Dichlormethan-Acetonitril als Eluiermittel an einer Silicagel-Säule chromatographiert und schließlich gelangt man durch Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeitssch chromatographie mit umgekehrten Phasen zum reinen Produkt. Gemäß einem anderen Verfahren wird das Mevinolin der Hydroxysäure- und Lacton-Form aus dem ähnlich wie oben gewonnenen Gärbrühe-Extrakt nach Gelfiltration an einer Sephadex LH-20-Säule und Vorfiltrieren an einer Waters Bondapack C₁₈/Porasil B-Säule an einer Waters μ C₁₈-Säule gewonnen und isoliert. Bei beiden Isolierungsverfahren werden 2 Extraktionsverfahren und ferner 4 beziehungsweise 3 chromatographische Schritte angewandt, und demzufolge sind diese Verfahren wegen ihrer Kompliziertheit und des mit ihnen verbundenen hohen Aufwandes für die technische beziehungsweise industrielle Verwirklichung nicht vorteilhaft. Es wurde außerdem ein präparatives analytisches Verfahren zur Bestimmung des Mevinolines und von Stoffen mit verwandter Struktur erarbeitet. Mit dem adsorptiven Harz XAD-2 wird das Mevinolin aus der Gärbrühe extrahiert, dann mit einem Isopropylalkohol-Ethylacetat-Dichlormethan-Gemisch vom Harz abgelöst, und es wird die biologische Aktivität des Eluates gemessen.

Von T. Kazuhiko und Mitarbeitern wurde das Mevinolin mittels des von R. L. Monaghan beschriebenen Extraktionsverfahrens aus dem Filtrat und den Zellen des *Monascus*-Stammes gewonnen. Aus dem durch Eindampfen der vereinigten Extrakte gewonnenen Rohprodukt wird das Mevinolin durch 3-mal hintereinander erfolgendes Chromatographieren an Silicagel-Säulen, und zwar an der ersten mit Dichlormethan-Ethylacetat-, an der zweiten mit n-Hexan-Aceton- und an der dritten mit Benzol-Ethylacetat-Gemischen gereinigt und dann kristallisiert. Auch dieses Verfahren eignet sich nicht für die technische beziehungsweise industrielle Verwirklichung.

Von A. Endo wurde das Mevinolin aus dem Filtrat der *Monascus ruber*-Kultur mit Ethylacetat extrahiert. Der Ethylacetat-Extrakt wird eingedampft, dann wird der Rückstand in Benzol gelöst. Die benzolische Lösung wird zuerst mit 5%-iger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen und dann mit 5%-iger, wäßriger Natriumhydroxydlösung vermischt, bis das Mevinolin aus der benzolischen Phase extrahiert wird. Das Mevinolin wird durch Kristallisieren des Eindampfrückstandes des Ethylacetat-Extraktes aus wäßrigem Aceton gewonnen. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß bei ihm nicht chromatographiert werden muß, sein Nachteil ist die verhältnismäßig hohe Anzahl der Extraktionsschritte und der hohe Bedarf an Lösungsmitteln. Das Verfahren befaßt sich nicht mit dem Isolieren des sich an die Zellen bindenden Mevinolines.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen neuen Mikroorganismus-Stamm und neues Verfahren zur Herstellung von β,δ-Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-hydro]-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure-δ-lacton und/oder von β,δ-Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure, durch welche das Mevinolin in höherer Konzentration und einfacher und schneller und unter günstigeren Bedingungen und dabei auch in technischem Maßstab hergestellt werden kann, zu schaffen.

Das Obige wurde überraschenderweise durch die Erfindung erreicht.

In eigenen Versuchen wurde nach Mikroorganismen-Stämmen gesucht, durch deren Verwendung das Mevinolin in einer höheren Konzentration und unter günstigeren Bedingungen als durch im Stand der Technik beschriebene Verfahren hergestellt werden kann. Während der sich auf insgesamt 20 000 Pilzstämme erstreckenden Untersuchungen gelang es, einen Mikroorganismus auszuwählen, der innerhalb einer kürzeren Zeit und in einem höheren Maße als die bekannten Stämme Mevinolin biosynthetisiert. Dieser Stamm konnte den eingehenden taxonomischen Untersuchungen zufolge mit keiner einzigen der Mevinolin produzierenden Pilzarten identifiziert werden und erwies sich als ein neuer, zum Typ des *Aspergillus* genus gehörender Stamm. Diese neue Art wurde als *Aspergillus obscurus* bezeichnet.

Die Erfindung beruht also auf der überraschenden Feststellung, daß der isolierte und als *Aspergillus obscurus* bezeichnete, neue imperfekte Pilzstamm des Holotyps MV-1 — welcher am 3. April 1992 unter der Nummer NCAIM (P)F 001189 in der Nationalen Sammlung für Landwirtschaftliche und Industrielle Mikroorganismen der Universität für Gartenbau und Lebensmittelindustrie, Budapest, Ungarn, hinterlegt wurde — in sehr hoher Konzentration Mevinolin zu erzeugen vermag, hauptsächlich in Form von offener Hydroxysäure der Formel II. Diese neue Art biosynthetisiert außer diesem Hauptprodukt nur in sehr geringer Menge Produkte mit verwandter Struktur <β,δ-Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure-methylester; 4,5a-Di-(hydro)-mevinolin> und eignet sich somit ausgezeichnet zur technischen beziehungsweise industriellen Herstellung des Mevinolines.

Gegenstand der Erfindung ist daher der Holotyp-Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1, hinterlegt am 3. April 1992 in der Nationalen Sammlung für Landwirtschaftliche und Industrielle Mikroorganismen der Universität für Gartenbau und Lebensmittelindustrie, Budapest, Ungarn unter der Nummer NCAIM(P)F 001189.

Die systematischen Merkmale der isolierten neuen Pilzart können, verglichen mit den wichtigsten diagnostischen Charakteristika der bekannten *Aspergillus*-Arten, wie folgt zusammengefaßt werden.

Die Bezeichnung *Aspergillus abscurus* n. sp. weist darauf hin, daß die Kulturen beziehungsweise Kolonien der Art auf zahlreichen synthetischen und komplexen Nährböden verschiedener Zusammensetzung dunkles, braunschwarzes Myzelgewebe und dunkles, lösliches Pigment (siehe die unten folgenden Tabellen 1 und 2) produzieren. Charakteristische Eigenschaften: an den sich verbreiternden, kurzen kolbenartigen Vesikeln der farblosen, meist gerade verlaufenden Konidiophoren befinden sich in 2 Reihen die Phialiden. Die an den Enden dieser sekundären Phialiden entstehenden Konidien sind rund oder oval, ihre Oberfläche ist glatt, ihr Durchmesser beträgt 2,0 µm (± 0,4 µm). Das reife Konidium-Luftmyzel hat eine hellbraune Farbe. Die die Konidien tragenden

Konidiophoren sind kolbenartige (40 bis 60 µm breite) Gebilde, kurz (< 60 bis 100 µm) und nicht säulenartig (siehe die Fig. 1 und 2). In Fig. 1 ist das mikroskopische Bild der konidientragenden Köpfchen des Vergleichsstammes *Aspergillus terreus* ATCC 20542 und in Fig. 2 das Bild der konidientragenden Köpfchen des erfundungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 zu sehen.

5

Tabelle 1

Makromorphologischer Vergleich der Kulturen des Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 mit dem Stamm *Aspergillus terreus* ATCC 20 542 auf Glycerin-Asparagin-Agar- und Glycerin-Tyrosin-Asparagin-Agar-Nährböden

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nährboden	Stamm <i>Aspergillus obscurus</i> n. sp. MV-1 [Erfundungsgemäßer Stamm]	Stamm <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20 542 [Vergleichsstamm]
Glycerin-Asparagin-Agar	Luftmyzel: pulverartig, mittelmäßig entwickelt, hellbraun. Substratmyzel: entwickelt, dunkelbraun, dann schwarz werdend. Kein lösliches Pigment.	Luftmyzel: entwickelt, pulverartig, braun. Substratmyzel: farblos, dann blaß braungelb. Kein lösliches Pigment
Glycerin-Tyrosin-Asparagin-Agar	Luftmyzel: schwach entwickelt, stellenweise pulverartig, braun. Substratmyzel: entwickelt, schwarz. Lösliches Pigment: schwarz	Luftmyzel: wollig, rostbraun, pulverartig. Substratmyzel: entwickelt, braun. Kein lösliches Pigment.

Tabelle

Vergleich des Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 mit dem Stamm *Aspergillus terreus* ATCC 20 542 hinsichtlich der Farbe von Substratmyzel (S.) und löslichem Pigment (L.P.) aus synthetischem Agar in Gegenwart verschiedener C- und N-Quellen

5

C- und N-Quelle		Stamm <i>Aspergillus obscurus</i> MV-1 [Erfindungsgemäßer Stamm]	Stamm <i>Aspergillus terreus</i> , ATCC 20 542 [Vergleichsstamm]	
Maltose	S. L.P.	schwarz dunkelbraun	farblos nicht vorhanden	10
Xylose	S. L.P.	schwarz dunkelbraun	hellbraun blaß braungelb	15
Arabinose	S. L.P.	dunkelbraun braun	farblos nicht vorhanden	
Glucose	S. L.P.	schwarz braun	farblos nicht vorhanden	20
Rhamnose	S. L.P.	braun nicht vorhanden	gelblichbraun nicht vorhanden	
Fructose	S. L.P.	schwarz dunkelbraun	farblos nicht vorhanden	25
Saccharose	S. L.P.	schwarz dunkelbraun	farblos nicht vorhanden	
Inosit	S. L.P.	braun braun	blaß braungelb nicht vorhanden	30
Mannit	S. L.P.	dunkelbraun braun	blaßbraun nicht vorhanden	
Raffinose	S. L.P.	dunkelbraun braun	blaß braungelb nicht vorhanden	35
Natriumcitrat	S. L.P.	dunkelbraun > schwarz dunkelbraun	hellbraun nicht vorhanden	
Ammoniumchlorid	S. L.P.	dunkelbraun > schwarz dunkelbraun	hellbraun nicht vorhanden	40
Calciumnitrat	S. L.P.	dunkelbraun > schwarz dunkelbraun	hellbraun nicht vorhanden	

S. = Farbe des Substratmycels

L.P. = Farbe des löslichen Pigmentes

Merkmale der Kulturen

Charakteristisch für die Kulturen des erfindungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 ist die Vorherrschaft der dunkelbraunen bzw. braunschwarzen Pigmentation (Tabellen 1 und 2).

50

Die Tabellen 1 und 2 beweisen mit aller Deutlichkeit, daß der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 sich durch eine außerordentlich intensive dunkelbraune bzw. schwarze Substratmyzel-Pigmentation auszeichnet und das Pigment diffusibel ist, in den meisten Fällen auch in den Nährboden übergeht. Diese Eigenschaften sind für den Vergleichsstamm *Aspergillus terreus* ATCC 20542 nicht charakteristisch. Bei letztem konnte nämlich nur in Gegenwart von Tyrosin und nur im Substratmyzel eine zum Dunklen neigende, braune Pigmentation beobachtet werden.

55

Physiologische Eigenschaften

60

Die *Aspergillus*-Stämme können im allgemeinen durch ein breites Kohlenstoffquellen verwertendes Spektrum charakterisiert werden. Das trifft auch für den erfindungsgemäßen Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 der auf Raffinose, Inosit, Saccharose, Fructose, Glucose und Maltose gut wächst, zu. Von den Stickstoffquellen verwertet der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 sowohl die Ammoniumsalze als auch die Nitrate gleich gut.

65

Taxonomie

Das an Konidien reiche Luftmyzel des erfindungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 zeigt zwar hinsichtlich der Farbe Ähnlichkeit mit den Arten *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes* und *Aspergillus terreus*, der erfindungsgemäße Stamm kann jedoch von den Mitgliedern dieser Artengruppen gut unterschieden werden, von den beiden letzteren vor allem hinsichtlich der konidientragenden Konidiophoren, da diese beim erfindungsgemäßen Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 nicht geschlossen oder unregelmäßig säulenartig sind (siehe Fig. 2), während er von *Aspergillus ustus* dadurch unterschieden werden kann, daß seine Konidien glatt und stachlig und außerdem seine reifen Konidiophoren ebenfalls nicht zylindrisch sind.

Beim Vergleich des erfindungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 mit dem Vergleichsstamm *Aspergillus terreus* ATCC 20542 aufgrund synchroner Untersuchungen konnte auch festgestellt werden, daß im Gegensatz zur schwachen Benomil-Empfindlichkeit des Vergleichsstammes *Aspergillus terreus* ATCC 20542 (50 µg/ml) der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 sehr empfindlich ist (10 µg/ml). Außerdem entwickelt sich der Vergleichsstamm *Aspergillus terreus* ATCC 20542 auf Galaktose, Xylose und Lactose stark, während der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 Galaktose und Lactose überhaupt nicht und Xylose kaum verwertet. Unterschiede wurden auch in der Verwertung von Natriumgluconat, Natriumsalicylat und Natriumbenzoat beobachtet. Auf diesen wächst der Vergleichsstamm *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mehr oder weniger gut, der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 hingegen schwach oder kaum.

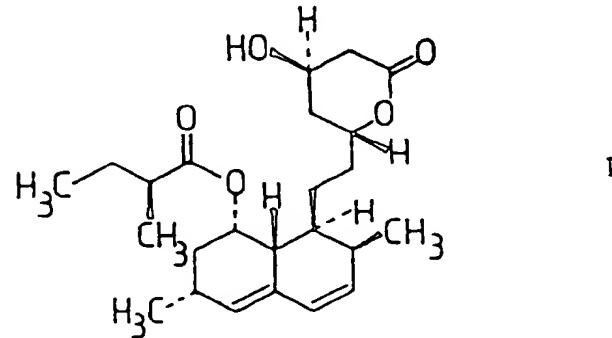
Aufgrund der obigen Ausführungen wurde der erfindungsgemäße Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 als neue Art der braunen Aspergillen durch Kennzeichnung mit dem spezifischen Attribut *Aspergillus obscurus* abgegrenzt.

Beim taxonomischen Vergleich des erfindungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 mit den bekannten *Aspergillus*-Arten bildeten folgende Arbeiten die Grundlage: Fassatiova, O.: Plsné a vlaknité honby v technické mikrobiologii. Praha. SNTL Naklad. Techn. Literatury. 1979.; Raper, K. B. und Fennell, D.: The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1965.; Subramanian, C. V.: The perfect state of *Aspergillus*. Current Science, 41, [1972], 755 bis 761.

Ferner gelang es in eigenen Versuchen, ein neues, technisch einfaches und wirtschaftliches Verfahren zur Isolierung des Mevinolins aus Gärbrühen zu erarbeiten. Bei der Biosynthese liegt das Mevinolin in der Gärbrühe bzw. Fermentbrühe hauptsächlich in Form von Salzen der offenen Hydroxsäure (β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure) der Formel II und nur zu einem geringen Teil als Lacton der Formel I vor. Nach dem Ende der Gährung kann das an die Pilzzellen gebundene Produkt durch Zugabe einer organischen oder anorganischen Base oder eines Gemisches von solchen, wie von 25 gew.-%-iger Ammoniumhydroxydlösung und darauffolgendes Rühren der basisch gemachten Gärbrühe in die Nährlösung gebracht, und die Pilzzellen können abfiltriert werden. Aus dem so gewonnenen Filtrat kann die Form der Mevinolin-Hydroxsäure der Formel II an Anionenaustauscher-Harzen selektiv gebunden und so das Gärbrühe-Filtrat von seinen neutralen oder basischen Bestandteilen abgetrennt werden. Das an der Anionenaustauscher-Säule gebundene Produkt kann mit einem Essigsäure-Wasser-Aceton-Gemisch eluiert und mittels Säure- und/oder Wärmebehandlung in das Mevinolin-lacton der Formel I überführt werden.

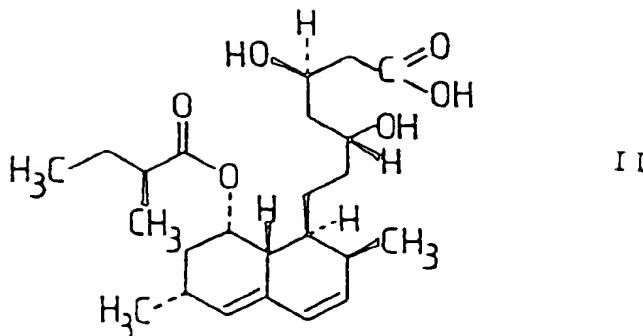
Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel

45



und/oder von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure der Formel

65



mittels aerober Gärung der gesenkten Kultur eines die Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II biosynthetisierenden imperfekten Pilzstammes auf einem assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und gegebenenfalls Mineralsalze enthaltendem Nährboden und Isolierung der Verbindung der Formel I, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein die obige(n) Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II produzierender Stamm der Pilzart *Aspergillus obscurus*, insbesondere der erfundungsgemäße Stamm, *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1, bei 25 bis 30°C, vorzugsweise bei sauren pH-Werten, insbesondere von 3,5 bis 6,5, gezüchtet wird sowie gegebenenfalls das (die) gebildete(n) Produkt(e) aus der Gärbrühe abgetrennt und dann in Form des Lactones der Formel I isoliert und gewünschtenfalls gereinigt wird/werden.

Die Verwendung des erfundungsgemäßen Stammes ist wegen seines schnellen Wachstums besonders vorteilhaft.

Vorzugsweise wird das Gären auf einem als Stickstoffquelle Hefeextrakt und/oder Pepton und/oder Casein und als Kohlenstoffquelle Glucose, Maltose und/oder Saccharose enthaltenden Nährboden durchgeführt. Vorteilhaft kann/können als Kohlenstoffquelle auch Sorbose, Fructose, Malzextrakt, Melasse, Maismehl, Glycerin und/oder wasserlösliche Stärke verwendet werden. Vorteilhaft kann/können als Stickstoffquelle auch Fleischextrakt, Maisquellwasser, Natriumnitrat, Ammoniumsulfat, Sojaöl, Sojamehl und/oder Fischmehl verwendet werden.

Beispiele für in den im erfundungsgemäßen Verfahren eingesetzten, der Erzeugung von Mevinolin dienenden Nährböden gegebenenfalls enthaltene Mineralsalze sind Magnesiumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, Spurenelemente, wie Kupfer-, Mangan- und Eisensalze, Vitamine und schaumhemmende Mittel.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird/werden das (die) während der Gärung entstehende(n) Produkt(e) mit einer dem Gärmedium zugesetzten organischen oder anorganischen Base oder einem Gemisch von solchen von den Pilzzellen abgelöst, dann an ein Anionenaustauscher-Harz gebunden und so aus der Gärbrühe abgetrennt und dann vom Harz eluiert sowie in der beim Eluieren erhaltenen Lösung einer Säure- und/oder Wärmebehandlung unterworfen und schließlich kristallisiert.

Gemäß einer speziellen vorteilhaften Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird wie folgt vorgegangen. Ein Inoculum-Nährboden wird mit einer von der Schrägagar-Kultur des erfundungsgemäßen Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 bereiteten filtrierten Sporensuspension geimpft und, dann wird ein produzierender Nährboden mit der 3-tägigen, bei 25 bis 30°C, vorzugsweise 28°C, gezüchteten Inoculum-Kultur geimpft. Dieser Nährboden wird 5 bis 7 Tage lang bei 25 bis 30°C, vorzugsweise 25°C, bebrütet. Während der Gärung bewegt sich der pH-Wert zwischen 3,5 und 6,5, vorteilhaft wird er auf einem Wert von 6,0 gehalten. Die Züchtung wird unter aeroben Bedingungen durchgeführt. In der Wachstumsphase (0 bis 20 Stunden) erfolgt eine Luftzufuhr von 400 l/Stunde, gerührt wird mit einer Umdrehungszahl von 400/Minute. Ab der 20. Stunde der Gärung wird bei unveränderter Luftzufuhr mit einer Umdrehungszahl von 600/Minute gerührt.

Während der Gärung wird der Wirkstoffgehalt der Gärbrühe mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie bestimmt. Beim Maximum des Wirkstoffgehaltes wird die Gärung abgebrochen. Bei der Analyse der Gärbrühe mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie werden die zentrifugierten Überstände der mit Acetonitril auf das 2,5-fache verdünnten Gärbrühe-Proben verwendet (Apparatur: LBK isokratisches System; Säulen-Füllstoff: Nucleosil C₁₈ 5 µm [BST]; Säulengröße: Vorlagekolonne 4 x 20 mm, analytische Kolonne 4 x 250 mm; thermostatisiert auf 60°C; Messung bei 238 nm; Eluiermittel: Gemisch von 471,6 g Acetonitril, 400 g Wasser und 0,39 g 85 gew.-%-iger Phosphorsäure; Strömungsgeschwindigkeit: 1,0 ml/min, Injektionsvolumen: 10 µl). Retentionszeiten: Mevinolin in Lacton-Form: 9,65 ± 0,05 Minuten; Mevinolin in Form von offener Hydroxysäure $\beta,\delta\text{-Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-(methyl)-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure}$: 6,62 ± 0,05 Minuten.

Der Wirkstoff wird von den Pilzzellen vorzugsweise mit einer Ammoniumhydroxydlösung abgelöst. Dieses Ablösen kann aber auch mit einer anderen Base, beispielsweise einer wäßrigen 2n Natriumhydroxydlösung oder einer wäßrigen Triethylaminlösung, durchgeführt werden.

Vorteilhaft wird als Anionenaustauscher-Harz zum Binden des (der) bei der Gärung entstehenden Produkte[s] Dowex 1 x 2(OH⁻), Dowex 2 x 4(OH⁻), Dowex 1 x 8(OH⁻) oder IRA 401S(OH⁻) verwendet.

Beim Gewinnen des Wirkstoffes aus der Gärbrühe mittels Anionenaustauscher werden vorzugsweise 2 in Reihe geschaltete Dowex 1 x 2-Säulen verwendet. Das Harz, welches von den Pilzzellen gut abgegrenzt werden kann, kann, statt in die Säulen gefüllt zu werden, auch unmittelbar in die Gärbrühe eingemischt werden, in welchem Falle jedoch etwa 20 Gew.-% mehr Harz benötigt werden.

Vorteilhaft wird das an der Säule gebundene Produkt mit einem Essigsäure-Wasser-Aceton-Gemisch, vor-

zugsweise in einem Volumverhältnis von 5,5 bis 6,0 : 40 bis 50 : 45 bis 55, insbesondere 5,7 : 44,3 : 50, eluiert. Es wird dann zweckmäßig wie folgt vorgegangen. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, und das Aceton wird unter Vakuum abdestilliert. Das so erhaltene wäßrige Konzentrat wird mit Schwefelsäure, vorzugsweise 15 gew.-%-iger Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 1,5, angesäuert und etwa 12 Stunden lang bei Raumtemperatur stehengelassen. In dieser Zeit erfolgt die Lactonbildung, die mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie verfolgt wird. Danach wird die Lösung mit Ethylacetat extrahiert, dann der Ethylacetat-Extrakt mit 10 gew.-%-iger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingedampft. Der Eindampfrückstand wird in Aceton gelöst, mit Aktivkohle geklärt und dann aus Ethanol umkristallisiert.

Eine andere vorteilhafte Möglichkeit zur Gewinnung von Produkten bietet die Eigenschaft des Stammes *Aspergillus obscurus*, daß sich das Produkt in stark saurem Medium, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 1,5 bis 2,5, insbesondere 2, praktisch vollständig an die Pilzzellen bindet, so daß das Filtrat nach dem Abfiltrieren der Zellen keine ins Gewicht fallende Menge des Produktes mehr enthält, und damit ein weiteres Aufarbeiten unnötig ist.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher nach dem Gären die Gärbrühe, insbesondere mit Schwefelsäure, ganz besonders 15 gew.-%-iger, auf einen stark sauren pH-Wert, insbesondere 1,5 bis 2,5, ganz besonders 2, angesäuert, das an die Pilzzellen gebundene β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-[methyl]-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel I mit einem Lösungsmittel für dieses, insbesondere Aceton, abgelöst und der erhaltene Extrakt, zweckmäßig unter Vakuum bei Raumtemperatur, eingedampft sowie gegebenenfalls etwaig im Eindampfrückstand enthaltene β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-[methyl]-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure der Formel II, vorteilhaft durch Erhitzen, insbesondere in Lösung in Toluol zu β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-[methyl]-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel I cyclisiert.

Von den Zellen wird das Mevinolin vorzugsweise mit Aceton abgelöst. Der acetonhaltige Extrakt wird zweckmäßig unter Vakuum bei Raumtemperatur eingedampft. Wenn gemäß der dünnenschichtchromatographischen Analyse im Rückstand noch Mevinolin in Form von Hydroxsäure der Formel II zu finden ist, wird dieses, zweckmäßig durch Erhitzen in Lösung in Toluol, insbesondere bis zum Siedepunkt des letzteren, zum Lacton cyclisiert.

Das so erhaltene Rohprodukt kann mittels Silicagel-Säulenchromatographie gereinigt werden. Vorzugsweise wird als Adsorbens Kieselgel 60 und als Eluiermittel ein Gemisch von Aceton und Benzol (im Volumverhältnis von 15 : 85), Aceton und Benzin (im Volumverhältnis von 30 : 70), Aceton und Dichlormethan (im Volumverhältnis von 15 : 85), Ethylacetat und Benzin (im Volumverhältnis von 30 : 70) oder Isopropylalkohol und n-Hexan (im Volumverhältnis von 5 : 95) verwendet. Das Produkt kann vorteilhaft an einer Mitteldrucksäule (1,5 bar), unter Verwendung eines Gemisches von Ethylacetat und n-Hexan (im Volumverhältnis von 50 : 50) gereinigt werden. Nach der Säulenchromatographie können die mevinolinhaltigen Fraktionen vereinigt und unter Vakuum eingedampft und der Rückstand aus einem aliphatischen Alkohol mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en), vorzugsweise aus Ethylalkohol, kristallisiert werden. Gut kristallisierbar ist das Mevinolin auch aus Benzol, Aceton, Ethylacetat und Acetonitril.

Der Vorteil des mit dem erfindungsgemäßen Holotyp-Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 durchgeführten erfindungsgemäßen Gärverfahrens besteht in der ausgeprägten Fähigkeit dieses neuen Mikroorganismus zur Biosynthese des Mevinolines in bedeutendem Maße. Der Hauptvorteil der ein Anionenaustauscher-Harz verwendenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es einfach durchführbar sowie mit geringem Aufwand verbunden ist und nur wenig organisches Lösungsmittel verwendet werden muß.

Ein anderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß sich durch das Ansäuern der Gärbrühe das biosynthetisierte Mevinolin in Form von Lacton oder Hydroxsäure fast ausschließlich an das Pilzmyzel bindet, so daß nach dem Filtrieren das Aufarbeiten eines großen Filtrat-Volumens vermieden werden kann.

Die Struktur der isolierten Produkte wurde mittels UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ und massenspektroskopischer Untersuchungen identifiziert.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert, wobei die Verhältnisse der Bestandteile der Lösungsmittel-Gemische für die Chromatographie Eluiermittel-Gemische stets Volumverhältnisse sind.

Beispiel 1

Von der 8 – 10 Tage alten, auf Malzextrakt und Hefeextrakt enthaltendem Schrägarag gezüchteten Kultur des Stammes *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1 NCAIM(P)F 001189 wird mit 5 ml 0,9 gew.-%-iger Natriumchlorid-Lösung eine Sporensuspension bereitet, und mit dieser werden in einem Erlenmeyer-Kolben (Fassungsvermögen: 500 ml) 100 ml MI-Inoculum-Nährboden folgender Zusammensetzung geimpft:

60	Glucose	40 g
	Caseinpepton	5 g
	Eisen(II)-sulfat \times 7 H ₂ O	0,01 g
	Kaliumchlorid	0,5 g
	Magnesiumsulfat \times 7 H ₂ O	0,5 g
65	Natriumnitrat	3 g
	Kaliumdihydrogenphosphat in 1000 ml Leitungswasser.	2 g

Der pH des Nährbodens wird vor dem Sterilisieren auf den Wert 6,0 eingestellt, und das Sterilisieren erfolgt 25 Minuten lang bei 121°C. Die Kultur wird an einem Mahlsieb-Schüttler (250 Umdrehungen/Minute, 2,5 cm Ausschlag) 3 Tage lang geschüttelt, dann werden mit 5 ml der erhaltenen, geschüttelten Inoculum-Kultur in einem Erlenmeyer-Kolben (Fassungsvermögen: 500 ml) jeweils 100 ml eines 25 Minuten lang bei 121°C sterilisierten MT-Nährbodens folgender Zusammensetzung geimpft:

Glucose	50 g	
Malzextrakt	30 g	
Gistex-Hefeextrakt	20 g	
Caseinpepton	20 g	
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g	
Natriumchlorid	10 g	

in 1000 ml Leitungswasser.

Der pH des Nährbodens wird vor dem Sterilisieren auf den Wert 5,5 eingestellt, und das Sterilisieren erfolgt 25 Minuten lang bei 121°C. Der Kolben wird an einem Mahlsieb-Schüttler (Temperatur: 25°C; 250 Umdrehungen/Minute, 2,5 cm Ausschlag) 5–7 Tage lang geschüttelt. Der Wirkstoffgehalt der Fermentbrühe wird mit der HPLC-Methode bestimmt. Die Fermentation wird über 144 Stunden fortgesetzt, dann wird das Mevinolin aus der Fermentbrühe gewonnen.

Aus 1 Liter Fermentbrühe, welche beim Stillstand der Fermentation insgesamt 400 µg/ml Mevinolin in Form von offener Hydroxysäure oder von Lacton enthält, wird das Produkt wie folgt isoliert.

Der nach Ablauf der Fermentation erhaltene 1 Liter Fermentbrühe wird mit 15 gew.-%iger Schwefelsäure auf einen pH von 2,0 angesäuert, dann nach 2 Stunden im Vakuum durch ein Filtertuch abfiltriert. Das Filtrat wird, da die Konzentration des Produktes in ihm gering ist (10–15 µg/ml), weggegossen. Das Pilzmyzel (etwa 80 g) wird mit 200 ml Aceton eine halbe Stunde lang gerührt, dann wird die Zellsuspension abfiltriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Der vereinte acetonhaltige Extrakt wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, dann im Vakuum eingedampft. Der Eindampfrest (etwa 4,5 g) wird in 50 ml Toluol aufgenommen, und die so gewonnene, mit Toluol bereitete Lösung wird mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie analysiert. Sofern die beim Ansäuern der Fermentbrühe entstehende β,δ-Dihydroxy-7-[1,2,6,7,8,8a-hexahydro-2,6-dimethyl-8-(2-methyl-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure nicht vollständig in Lacton übergegangen ist, wird die mit Toluol bereitete Lösung eine Stunde lang erhitzt, dann wird die Umbildung erneut überprüft. Danach werden aus der mit Toluol bereiteten Lösung die nicht löslichen Teile herausfiltriert, und die toluolhaltige Phase wird mit 20 ml 5 gew.-%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit 20 ml Wasser gewaschen. Dann wird die mit Toluol bereitete Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. So erhält man 1,5–2,0 g öliges Rohprodukt. Das Rohprodukt wird an einer aus 20 g Kieselgel 60 (0,063–0,2 mm) Adsorbens gefertigten Säule (Höhe: 20 cm, Durchmesser: 1,6 cm) chromatographiert. Bei der Fertigung der Chromatographie-Säule wird das Adsorbens in einem Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) suspendiert. Das Rohprodukt wird mit einem Kieselgel 60-Adsorbens des gleichen Gewichts, in 10 ml Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) suspendiert auf die Säule aufgetragen. Dann wird die Säule mit 100 ml Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) eluiert. Aus dem Eluat werden Fraktionen von 10 ml gesammelt. Die Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. (Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolie, Lösungsmittelgemisch: Aceton-Hexan (40 : 60), R_f des Mevinolins: 0,5). Die Fraktionen 6–10 enthalten das Mevinolin, bei deren Eindampfen im Vakuum erhält man 360 mg gelblich-weißen, festen Eindampfrest. Dieser wird aus Benzol (etwa 3 ml) umkristallisiert, dann wird das abgeschiedene Produkt an einem Glasfilter G-4 abfiltriert. Auf dem Filter wird der kristalline Niederschlag mit 5 ml Hexan gewaschen, dann im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. So erhält man 255 mg chromatographisch reines Mevinolin. Schmelzpunkt 160–162°C. Beim erneuten Kristallisieren des Eindampfrestes der Umkristallisierungs-Mutterlauge aus Benzol erhält man weitere 25 mg Mevinolin, welches dieselbe Qualität wie die erste Generation aufweist.

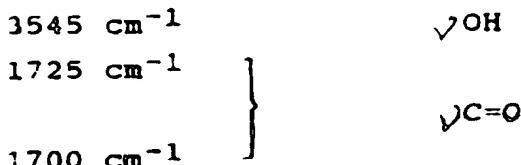
Spektroskopische Charakteristika des erhaltenen Produkts

Ultraviolet-Spektrum (Methanol, 10 µg/ml):

λ_{max} 231, 239, 247 nm

E 1%_{cm} 530, 620, 410

Infrarot-Spektrum (KBr-Pastille):



¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm, J/Hz):

6,00 (1H) d	4-H	$J_{3,4}=9,7$
5,79 (1H) dd	3-H	$J_{2,3}=6,1$
5,53 (1H) dd	5-H	$J_{5,6}=3,5; J_{5,8}=2,8$
5,39 (1H) m	8-H	
4,61 (1H) m	5-H	
4,37 (1H) m	8-H	
2,74 (1H) dd	α -H _{ax}	$J_{\alpha-\text{H}_{\text{ax}}, \alpha-\text{H}_{\text{ekv}}}=17,6;$ $J_{\alpha-\text{H}_{\text{ax}}, \beta-\text{H}}=5,0$
2,62 (1H) m	α -H _{ekv}	$J_{\alpha-\text{H}_{\text{ekv}}, \beta-\text{H}}=3,8;$ $J_{\alpha-\text{H}_{\text{ekv}}, \gamma-\text{H}_{\text{ekv}}}=1,5$
1,11 (3H) d	2-CH ₃	
1,08 (3H) d	2'-CH ₃	
0,90 (3H) d	6-CH ₃	
0,88 (3H) t	4'-CH ₃	

25 Massenspektrum (EI, 70 eV):

Molekül-Ion: 404

Charakteristische Ionen: 404 (M⁺ ·), 386 (/M-H₂O/+ ·), 302 (/M-C₄H₉COOH/+ ·), 284 (/302-H₂O/+ ·), 224, 198, 172, 159, 157, 57.

30 Beispiel 2

Mit 800 ml der wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellten, geschüttelten Inoculum-Kultur werden in einem Labor-Fermentor (Nutzvolumen: 10 Liter) 9,2 Liter eines 45 Minuten lang bei 121°C sterilisierten, produzierenden Nährbodens MT/1 geimpft. Nach dem Impfen wird der Fermentor bei 25°C in Betrieb genommen, wobei stündlich 400 Liter sterile Luft durchgeblasen werden und der Flat-blade-Mischer mit einer Umdrehungszahl von 600/Minute läuft.

40 Zusammensetzung des Nährbodens MT/1

Maltose	60 g
Malzextrakt	30 g
Gistex-Hefeextrakt	20 g
Caseinpepton	20 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Natriumchlorid	10 g

in 1000 ml Leitungswasser.

50 Der pH des Nährbodens wird vor dem Sterilisieren auf den Wert 5,5 eingestellt. Die Fermentation wird 120–144 Stunden lang fortgesetzt, dann wird aus der Fermentbrühe das Mevinolin gewonnen. Den erhaltenen 9,5 Litern Fermentbrühe, die am Ende der Fermentation, hauptsächlich in Form von offener Hydroxsäure und in kleinerer Menge in Form von Lacton vorliegend, 850 µg/ml Mevinolin enthielten, werden 300 ml 25 gew.-%-iges Ammoniumhydroxyd zugesetzt, dann wird das Gemisch 3 Stunden lang gerührt und filtriert. Das Filtrat enthält 5,56 g (69%) Mevinolin, welches in Form von Hydroxsäure-Salzen vorliegt. Dem abfiltrierten Pilzmyzel werden 5 Liter 3 gew.-%-ige Ammoniumhydroxyd-Lösung zugesetzt, und die Myzel-Suspension wird 2 Stunden lang gerührt, dann filtriert.

55 Das Filtrat enthält 2,1 g (26%) Mevinolin, welches hauptsächlich in Form von Hydroxsäure-Salzen vorliegt. Die beiden Filtrate werden vereint, und man lässt sie durch 2 in Reihe geschaltete, jeweils aus 150 g (270 ml) Dowex 1 × 2 (OH⁻)-Harz gefertigte Säulen (Säulendurchmesser: 32 cm, Höhe des Harzbettes: 34 cm) mit einer Geschwindigkeit von 1100 ml/Stunde durchlaufen, danach wird das Harzbett mit 1 Liter ionenfreiem Wasser gewaschen. Dann wird das Harz mit 2 Liter Essigsäure-Wasser-Aceton-Gemisch (5,7 : 44,3 : 50) eluiert und dabei in Fraktionen von 200 ml gesammelt. Das Eluat wird mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Adsorbens wird Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolie (Merck), als Lösungsmittelgemisch ein Aceton-n-Hexan-Essigsäure-Gemisch (40 : 60 : 1), als Entwickler Phosphormolybdänsäure-Reagens (1,5 g Phosphormolybdänsäure + 40 ml Methanol + 40 ml Wasser + 10 ml cc. Schwefelsäure) verwendet. Der R_f-Wert des Mevinolins in Form der offenen Säure beträgt 0,4, der R_f-Wert des Mevinolins 0,6. Die diese beiden Produkte enthaltenden Fraktionen werden vereint, und ihr Acetongehalt wird im Vakuum abdestilliert. Danach wird aus dem im wäßrigen Konzen-

trat überwiegend in Form von offener Säure vorliegenden Mevinolin Lacton gebildet, indem man dem Konzentrat 60 ml 15 gew.-%ige Schwefelsäure zusetzt und es bei Raumtemperatur 12 Stunden lang stehenläßt. Die Lacton-Bildung wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach Beendigung der Lactonbildung wird die Lösung zweimal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert, dann werden die Ethylacetat enthaltenden Extrakte vereint und zweimal mit je 100 ml 10 gew.-%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, danach mit 100 ml Wasser gewaschen. Die Ethylacetat enthaltende Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. So erhält man 17,5 g Rohprodukt, welches in 200 ml Aceton gelöst und mit 4 g Aktivkohle geklärt wird. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wird die Ethylacetat-Lösung im Vakuum eingedampft. Man erhält 15,7 g festen Eindampfrest, der aus 55 ml Ethylalkohol umkristallisiert wird. Das ausgeschiedene kristalline Produkt wird an einem G-4-Filter abfiltriert und mit 100 ml n-Hexan gewaschen. Die so gewonnenen 9,7 g leicht gelblicher, kristalliner Stoff werden aus 30 ml Ethylalkohol erneut umkristallisiert. Das ausgeschiedene Mevinolin wird abfiltriert, mit 50 ml n-Hexan gewaschen und im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. So erhält man 5,71 g (71%) chromatographisch reines Produkt.

Schmelzpunkt: 160—162°C (Boetius).

Die spektroskopischen Daten des Produktes stimmen mit den in Beispiel 1 angegebenen Werten überein.

Nach Eindampfen der vereinten Umkristallisierungs-Mutterlaugen im Vakuum erhält man 8 g Eindampfrest, welcher in 75 ml Ethylacetat gelöst und zweimal mit je 35 ml 10 gew.-%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit 35 ml Wasser gewaschen wird. Die Ethylacetat-Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die so gewonnenen 4,8 g Rohprodukt werden an einer aus 60 g Kieselgel 60-Adsorbens gefertigten Säule (Säulendurchmesser: 2,3 cm, Füllhöhe: 25 cm) chromatographiert.

Als Elutionsgemisch wird ein Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) verwendet. Das zu reinigende Produkt wird mit 2 g Kieselgel 60-Adsorbens in 20 ml Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) suspendiert und auf die Chromatographie-Säule aufgetragen. Danach wird die Säule mit 400 ml Aceton-Dichlormethan-Gemisch (15 : 85) eluiert und in Fraktionen von 50 ml gesammelt. Die Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Adsorbens wird Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolie (Merck), als Lösungsmittel Aceton-n-Hexan-Gemisch (40 : 60) verwendet. Der R_f des 4a,5-Dihydro-mevinolins beträgt 0,52. In Fraktion 3 erscheint das 4a,5-Dihydro-mevinolin, in den Fraktionen 4—8 das Mevinolin an der Säule. Die mevinolinhaltigen Fraktionen werden vereint und im Vakuum eingedampft. Die erhaltenen 2 g Eindampfrest werden aus 15 ml Ethylalkohol kristallisiert. Der ausgeschiedene Stoff wird an einem G-4-Filter abfiltriert, am Filter mit 10 ml n-Hexan gewaschen, dann bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. So erhält man 0,73 g (9%) chromatographisch reines Mevinolin.

Schmelzpunkt: 162—168°C (Boetius).

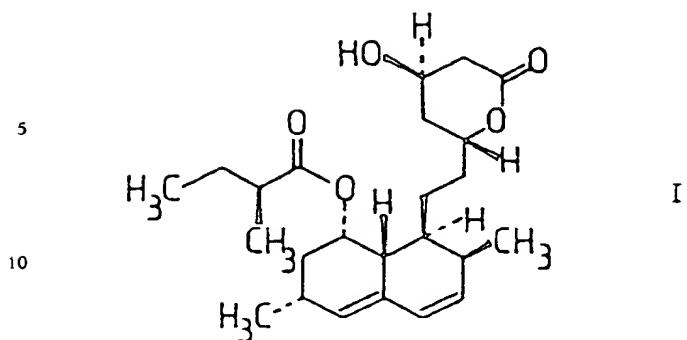
Beispiel 3

Der pH der gemäß Beispiel 1 hergestellten 1 Liter Fermentbrühe wird mit 15 gew.-%iger Schwefelsäure auf den Wert 2 eingestellt. Die angesäuerte Fermentbrühe wird dreimal mit je 250 ml Ethylacetat extrahiert, dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die erhaltenen 6 g Eindampfrest werden in 50 ml Toluol gelöst und 2 Stunden lang bei Siedetemperatur gehalten. Die Entstehung des sich aus der Hydroxsäure-Form des Mevinolins bildenden Lactons wird mittels HPLC-Messung in der in Beispiel 1 angegebenen Weise kontrolliert. Nach Vervollständigung der Bildung der Lacton-Form wird das Toluol mit 25 ml 10 gew.-%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit 25 ml Wasser gewaschen. Nach Eindampfen der mit Toluol bereiteten Lösung erhält man dann 4,5 g Eindampfrest. Dieses Rohprodukt wird unter einem Druck von 1,5 bar an 300 g Kieselgel G-Säule chromatographiert. Zur Fertigung der Säule wird vorher getrocknetes (von Kalziumhydrid bzw. Phosphorpentoxid destilliertes) Ethylacetat-n-Hexan-Gemisch (50 : 50) verwendet. Das Produkt wird in 20 ml Benzol gelöst und auf die Chromatographie-Säule aufgetragen. Das Ablösen des Mevinolins erfolgt mit Ethylacetat-n-Hexan-Gemisch (50 : 50). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden im Vakuum eingedampft, und die erhaltenen 400 mg Eindampfrest werden aus 3 ml Ethylalkohol kristallisiert. Die ausgeschiedenen Kristalle werden an einem G-4-Filter abfiltriert, am Filter mit 10 ml n-Hexan gewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. So erhält man 280 mg chromatographisch reines Mevinolin.

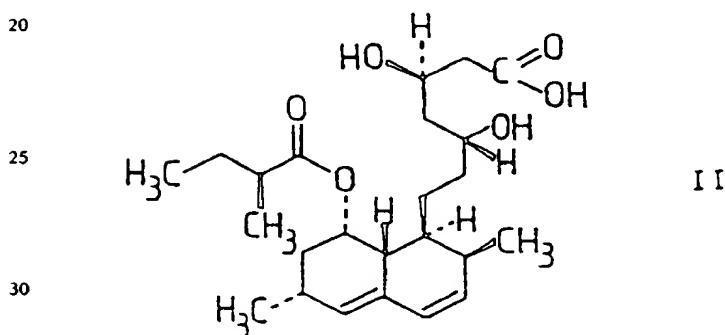
Schmelzpunkt: 162—165°C (Boetius).

Patentansprüche

1. Holotyp-Stamm *Aspergillus obscurus* n. sp. MV-1, hinterlegt am 3. April 1992 in der Nationalen Sammlung für Landwirtschaftliche und Industrielle Mikroorganismen der Universität für Gartenbau und Lebensmittelindustrie, Budapest, Ungarn unter der Nummer NCAIM(P)F 001189.
2. Verfahren zur Herstellung von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel



und/oder von β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure der Formel



mittels aerober Gärung der gesenkten Kultur eines die Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II biosynthetisierenden imperfekten Pilzstammes auf einem assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und gegebenenfalls Mineralsalze enthaltendem Nährboden und Isolierung der Verbindung der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man einen die obige(n) Verbindung(en) der Formel(n) I und/oder II produzierenden Stamm der Pilzart *Aspergillus obscurus*, insbesondere den Stamm gemäß Anspruch 1, bei 25 bis 30°C züchtet sowie gegebenenfalls das (die) gebildete(n) Produkt(e) aus der Gärbrühe abtrennt und dann in Form des Lactones der Formel I isoliert und gewünschtenfalls reinigt.

40 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gären auf einem als Stickstoffquelle Hefeextrakt und/oder Pepton und/oder Casein und als Kohlenstoffquelle Glucose, Maltose und/oder Saccharose enthaltenden Nährboden durchführt.

45 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man das (die) während der Gärung entstehende(n) Produkt(e) mit einer dem Gärmedium zugesetzten organischen oder anorganischen Base oder einem Gemisch von solchen von den Pilzzellen ablöst, dann an ein Anionenaustauscher-Harz bindet, und aus der Gärbrühe abtrennt und dann vom Harz eluiert sowie in der beim Eluieren erhaltenen Lösung einer Säure- und/oder Wärmebehandlung unterwirft und schließlich kristallisiert.

50 5. Verfahren nach Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Anionenaustauscher-Harz Dowex® 1 × 2(OH⁻), Dowex® 2 × 4(OH⁻), Dowex® 1 × 8(OH⁻) oder IRA 401S(OH⁻) verwendet.

55 6. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Gären die Gärbrühe auf einen stark sauren pH-Wert ansäuert, das an die Pilzzellen gebundene β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel I mit einem Lösungsmittel für dieses ablöst und den erhaltenen Extrakt eindampft sowie gegebenenfalls etwaig im Eindampfrückstand enthaltene β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure der Formel II zu β,δ -Di-(hydroxy)-7-[1,2,6,7,8,8a-hexa-(hydro)-2,6-di-(methyl)-8-(2'-{methyl}-butyryloxy)-naphthalin-1-yl]-heptansäure- δ -lacton der Formel I cyclisiert.

60 Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

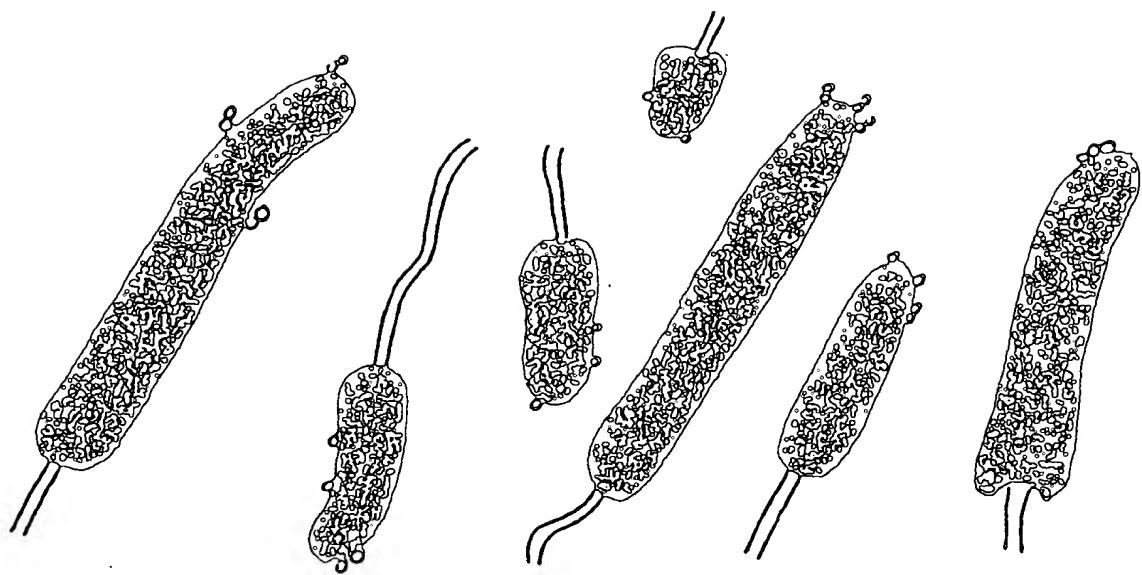


Fig. 1

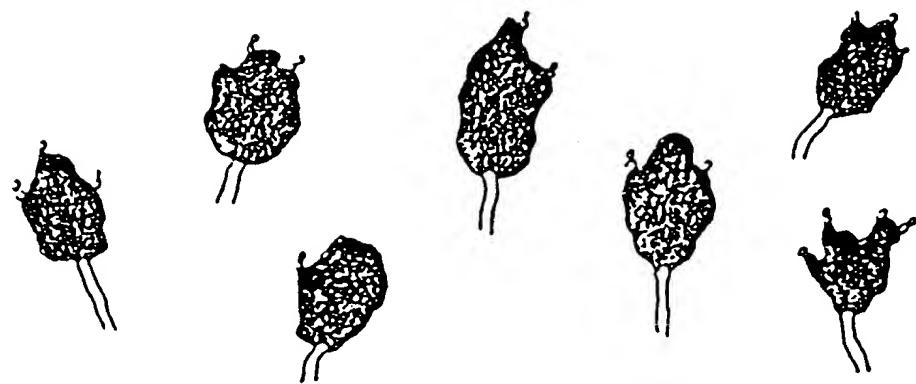


Fig. 2